

PCT

REC'D 11 JUN 1997

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

WIPO

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51155AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 96/ 00823	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/02/1996	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/03/1995
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/58		
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.


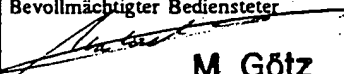
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt 7 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

CORRECT
VERSION

Datum der Einreichung des Antrags 16/08/1996	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 09.06.97
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  M. Götz Tel. (+49-89) 2399-8687

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1 - 18, 20 - 38_____	JA
	Ansprüche 19_____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche 1 - 18, 20 - 34, 36 - 38_____	JA
	Ansprüche 19, 35_____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1 - 38_____	JA
	Ansprüche _____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. Das Verfahren gemäß Ansprüchen 1 - 18 ist nunmehr auf heterogene Immunoassays beschränkt und somit vom Verfahren gemäß

D1 = DATABASE WPI, Section Ch, week 9145, Derwent Publications Ltd., London, GB, Class B04, AN 91-329371 [45] XP002008119, & JP-A-03 220 442, 27.09.1991

abgegrenzt. D1 beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Antikörper- oder Antigenkonzentrationen in flüssigen Proben, bei dem Antikörper oder Antigene mit magnetischen Partikeln markiert werden, eine Agglutinationsreaktion durchgeführt, ein magnetisches Feld angelegt und wieder abgeschaltet, und die magnetische Remanenz der agglutinierten Partikel gemessen wird.

Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Erfindung um die Messung einzelnen gebundener, nicht agglutinierten magnetischer Nanoteilchen. Da das erfindungsgemäße Verfah-

ren die mit einer Teilchenagglutinierung verbundenen Nachteile umgeht, erfüllen die Verfahrensansprüche 1 - 18 sowie der darauf bezogene Verwendungsanspruch 25 die Erfordernisse gemäß Art. 33(2) und (3) PCT.

2. Da keines der zur Verfügung stehenden Dokumente des Standes der Technik ein Verfahren gemäß Anspruch 26 beschreibt, in dem die Messung der magnetischen Remanenz in vivo verwendet wird, erfüllt Anspruch 26 sowie die davon abhängigen oder darauf bezogenen Ansprüche 27 - 34 ebenfalls die Kriterien gemäß Art. 33(2) und (3) PCT.
3. Da es im vorliegenden Fall nicht möglich zu sein scheint, die technische Merkmale einer Verbindung durch eine beabsichtigte Verwendung zu definieren, sondern lediglich durch ihre Struktur, da weiters Anspruch 19 keinerlei Größenangaben bezüglich Meß- oder Relaxationszeiten enthält, sind die darin beanspruchten Verbindungen nicht gegenüber den aus

D2 = US-4 661 408

bekannten beschichteten ferromagnetischen Chromdioxid-Partikel abgegrenzt, die im Rahmen eines Immunoassays auch an Antikörper gebunden werden.

Anspruch 19 erfüllt daher nicht die Erfordernisse gemäß Art. 33(2) PCT.

- 3.1. Unter analogen Gesichtspunkten beruht der Gegenstand des Anspruchs 35 nicht auf erfinderischer Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).
- 3.2. Da in Ansprüchen 20 - 24 sowie 36 - 38 technische Eigenschaften geeigneter Verbindungen oder Mittel angegeben werden, die im Gegensatz zu der in D1 geforderten "low coercivity" und "low remanent magnetism" der dort offen-

barten Marker stehen, erfüllen diese Ansprüche die Erfordernisse gemäß Art. 33(2) und (3) PCT.

Beim in der Druckschrift JP3-220442A offenbarten Verfahren wird die Bestimmung eines Antigentiters durch die Messung des Ausmaßes der antikörpervermittelten Aggregation (Agglutination) mit Hilfe eines in der Druckschrift offenbarten Verfahrens zur Messung der Teilchengrößen agglomerierter magnetischer Teilchen durchgeführt. Das Verfahren der Bestimmung der Teilchengröße besteht darin, ein Magnetfeld, welches die ortsfeste sedimentierte Probe durchdringt, zu schalten, und die residuale magnetische Flußdichte der agglomerierten magnetischen Teilchen zu messen.

Aus der Druckschrift US-4,661,408 sind Ferrofluide bekannt, die superparamagnetische Teilchen aus Chromdioxid mit daran gekoppelten Antikörpern enthalten. Es wird dort beansprucht, daß diese Teilchen sehr kleine intrinsische Relaxationszeiten aufweisen, sie entsprechen deshalb den Anforderungen für die Anwendung in Remanenzmessungen nicht.

Patentansprüche

1. ✓ Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß stabile oder quasistabile ferro- oder
5 ferrimagnetische Substanzen als nachzuweisende magnetische Markierung in heterogenen Immunoassays eingesetzt werden und die remanente Magnetisierung der Probe als Meßgröße bestimmt wird.
2. ✓ Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in
10 heterogenen Immunoassays, dadurch gekennzeichnet, daß gebundene magnetische Marker zum Zeitpunkt der Messung in ihrer Gesamtheit eine remanente Magnetisierung der Probe bewirken, während die Magnetisierung ebenfalls in der Probe vorhandener ungebundener magnetischer Marker zum
15 Zeitpunkt der Messung in ihrer Gesamtheit durch extrinsischen Superparamagnetismus abgeklungen ist.
3. ✓ Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in
heterogenen Immunoassays, dadurch gekennzeichnet, daß
20 (i) zunächst strukturspezifische Substanzen mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend
(ii) diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen zu der zu vermessenden Probe gegeben werden,
(iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und
25 (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei die durch spezifische Bindung auftretende Remanenz und deren Ausmaß zur Analyse herangezogen wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, daß anstelle der strukturspezifischen Substanzen nachzuweisende Analyte mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und den zu vermessenden Proben die strukturspezifischen Substanzen zugesetzt werden.

35

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen, Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
5
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
10
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe während der Messung bewegt und damit das Probensignal moduliert wird.
20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren als Gradiometer geschaltete Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
25
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren SQUIDS eingesetzt werden.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch stufenweise Magnetisierung der zu vermessenden Probe eine simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Analyten durchgeführt wird.
30
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß für eine simultane quantitative Bestimmung von Analyten unterschiedliche ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit diskreten Koerzitivfeldstärken verwendet werden.
35

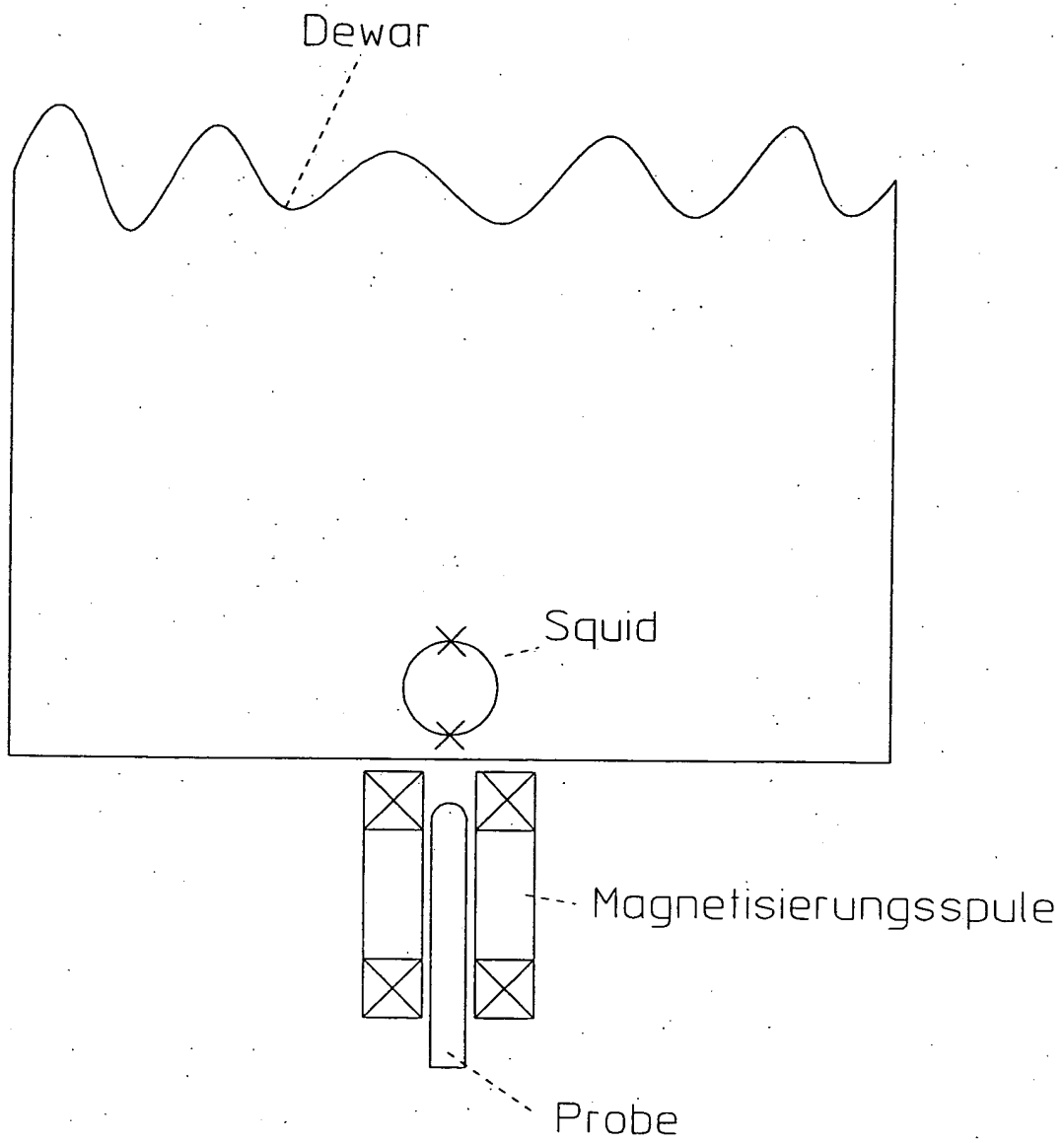
13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die intrinsische Néel-Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen größer als die Messzeit ist.
- 5 14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Néelsche Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen bei 20°C länger als 10^{-4} Sekunden ist.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Néelsche Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen bei 20°C länger als 1 Sekunde ist.
- 15 16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 1 bis 1000 nm aufweisen.
- 20 17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 2 bis 500 nm aufweisen.
- ✓ 18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, synthetischen Polymeren und/ oder Lipiden
25 stabilisiert sind.
- 30 19. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen von stabilen oder quasistabilen ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen bestehen.
- 35 20. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die länger als 10^{-4} Sekunden ist.

21. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen und ferromagnetischen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die längerer als 1 Sekunde ist.
- 5
22. Verbindungen gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten, Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten, sonstige spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
- 10
23. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1 - 18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen stabile oder quasistabile kolloidale Teilchen aus Eisenoxiden, Bariumferrit, Strontiumferrit, Reineisen, Chromdioxid, Nickel, Kobalt sowie Eisenoxiden mit Mangan-, Kupfer-, Nickel- oder Kobaltzusätzen sind.
- 15
24. Mittel zur Verwendung in Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit unterschiedlichen Koerzitivfeldstärken enthalten.
- 20
25. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 18 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik oder medizinischen Diagnostik.
- 25
26. Verfahren zur Detektion von in den menschlichen Körper eingebracht oder auf den menschlichen Körper aufgetragener ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Remanenz der Magnetisierung der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen nach Abschalten eines magnetisierenden Feldes bestimmt wird.
- 30
27. Verfahren zur Detektion in den menschlichen Körper eingebracht oder auf den menschlichen Körper aufgetragenen ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst
- 35
- (i) strukturspezifische Substanzen mit ferrimagnetischen oder

- ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend
(ii) diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen in den lebenden Organismus eingebracht oder auf den Organismus aufgetragen werden,
5 (iii) das interessierende Volumen des Organismus mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und
(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird.
- 10 28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß als strukturspezifische Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder
15 Lipoproteine verwendet werden.
29. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifisch an Rezeptoren bindenden Agonisten oder Antagonisten Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten sind.
- 20 30. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
- 25 31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
- 30 32. Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDS), Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
- 35 33. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 19 bis 23, in Verfahren gemäß den Ansprüchen 27 bis 32.

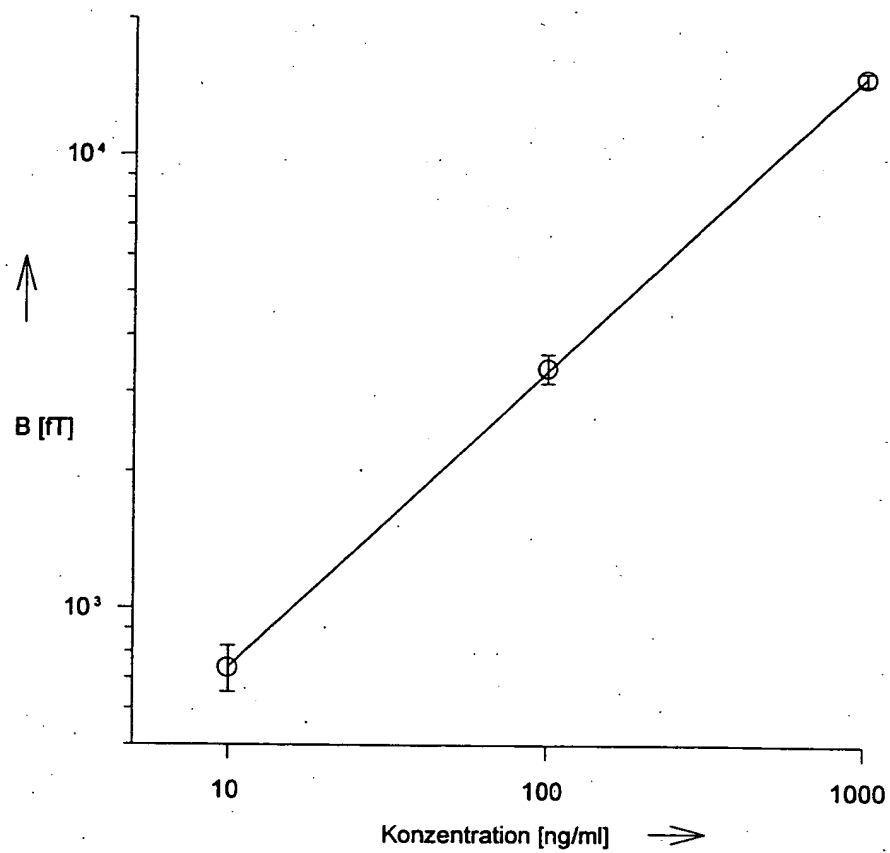
34. Verwendung ferri- oder ferromagnetischen Substanzen in Verfahren gemäß Anspruch 26.
- 5 35. Mittel zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 27 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mischung verschiedener ferri- oder ferromagnetischer Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen enthalten.
- 10 36. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 32, dadurch gekennzeichnet, die Néel-Relaxationszeit der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen bei 37°C größer als 10^{-4} Sekunden ist.
- 15 37. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Néel-Relaxationszeit der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen bei 37°C größer als 1 Sekunde ist.
- 20 38. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 36 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß die ferri- oder ferromagnetischen Substanzen Eisenoxide oder Eisenoxide mit Mangan-, Kupfer-, Nickel- oder Kobaltzusätzen sind.

Fig. 1



Probe wird während der Messung entfernt

Fig. 2



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/58 G01N33/543 C12Q1/00 C12Q1/68 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9145 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 91-329371 [45] XP002008119 & JP,A,03 220 442 (TDK CORP.) , 27 September 1991 see abstract</p> <p>---</p>	1-5, 19, 22, 25
A	<p>EP,A,0 180 384 (TECHNICON INSTRUMENTS CORPORATION) 7 May 1986</p> <p>---</p>	
A	<p>US,A,4 661 408 (H.-P. P. LAU ET AL.) 28 April 1987</p> <p>---</p>	
A	<p>WO,A,91 15243 (NYCOMED AS.) 17 October 1991 cited in the application</p> <p>---</p>	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 1996

Date of mailing of the international search report

22. 07. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-180384	07-05-86	AU-B- 595165	29-03-90
		AU-B- 4902985	08-05-86
		CA-A- 1314769	23-03-93
		JP-A- 61181967	14-08-86
		US-A- 5206159	27-04-93

US-A-4661408	28-04-87	CA-A- 1289873	01-10-91
		DE-A- 3776180	05-03-92
		EP-A- 0240770	14-10-87
		IE-B- 60178	15-06-94
		JP-C- 1773233	14-07-93
		JP-B- 4063813	13-10-92
		JP-A- 62226817	05-10-87

WO-A-9115243	17-10-91	AU-B- 655175	08-12-94
		AU-B- 7565591	30-10-91
		CA-A- 2079688	03-10-91
		EP-A- 0523116	20-01-93
		JP-T- 6507371	25-08-94
		US-A- 5384109	24-01-95

DE-A-3027012	05-02-81	FR-A- 2461521	06-02-81
		JP-C- 1669794	12-06-92
		JP-B- 3035973	30-05-91
		JP-A- 56095331	01-08-81
		US-A- 4329241	11-05-82

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/58 G01N33/543 C12Q1/00 C12Q1/68 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9145 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 91-329371 [45] XP002008119 & JP,A,03 220 442 (TDK CORP.) , 27.September 1991 siehe Zusammenfassung ---	1-5,19, 22,25
A	EP,A,0 180 384 (TECHNICON INSTRUMENTS CORPORATION) 7.Mai 1986 ---	
A	US,A,4 661 408 (H.-P. P. LAU ET AL.) 28.April 1987 ---	
A	WO,A,91 15243 (NYCOMED AS.) 17.Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt ---	
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11.Juli 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22.07.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-180384	07-05-86	AU-B- 595165	29-03-90
		AU-B- 4902985	08-05-86
		CA-A- 1314769	23-03-93
		JP-A- 61181967	14-08-86
		US-A- 5206159	27-04-93

US-A-4661408	28-04-87	CA-A- 1289873	01-10-91
		DE-A- 3776180	05-03-92
		EP-A- 0240770	14-10-87
		IE-B- 60178	15-06-94
		JP-C- 1773233	14-07-93
		JP-B- 4063813	13-10-92
		JP-A- 62226817	05-10-87

WO-A-9115243	17-10-91	AU-B- 655175	08-12-94
		AU-B- 7565591	30-10-91
		CA-A- 2079688	03-10-91
		EP-A- 0523116	20-01-93
		JP-T- 6507371	25-08-94
		US-A- 5384109	24-01-95

DE-A-3027012	05-02-81	FR-A- 2461521	06-02-81
		JP-C- 1669794	12-06-92
		JP-B- 3035973	30-05-91
		JP-A- 56095331	01-08-81
		US-A- 4329241	11-05-82

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 51155AWOM1XX	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 96/00823	International filing date (day/month/year) 29/02/1996	Priority date (day/month/year) 01/03/1995
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/58		
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>7</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16/08/1996	Date of completion of this report 09/06/1997
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

1. Basis of the report

This report has been drawn on the basis of: *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1 - 15 . as originally filed.
pages _____ . filed with the demand.
pages 1a . filed with the letter of 26/02/97
pages _____ . filed with the letter of _____
- ☒ the claims. Nos. _____ . as originally filed.
Nos. _____ . as amended under Article 19.
Nos. _____ . filed with the demand.
Nos. 1 - 38 . filed with the letter of 20/05/97
Nos. _____ . filed with the letter of _____
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/2 - 2/2 . as originally filed.
sheets/fig _____ . filed with the demand.
sheets/fig _____ . filed with the letter of _____
sheets/fig _____ . filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18, 20-38	YES
	Claims	19	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-18, 20-34, 36-38	YES
	Claims	19, 35	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-38	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The method/process according to claims 1-18 is now restricted to heterogeneous immunoassays and is therefore distinguished from the process according to

D1 = DATABASE WPI, Section Ch, week 9145,
Derwent Publications Ltd, London, GB, Class B04,
AN 91-329371 (45) XP002008119, & JP-A-03 220 442,
27.09.1991

D1 describes a process for determining antibody or antigen concentrations in liquid samples wherein, after antibodies or antigens have been labelled with magnetic particles, an agglutination reaction is performed and a magnetic field is applied and then withdrawn, and the residual magnetism of the agglutinated particles is measured.

By contrast, the present invention is concerned with the measurement of individually bound, nonagglutinated magnetic nanoparticles. Since the process according to the invention avoids the disadvantages associated with particle agglutination, the process claims 1-18 and the use claim 25 referring to them fulfil the requirements

of PCT Article 33(2) and (3).

2. Since none of the prior art documents available describes a process as per claim 26, according to which residual magnetism is measured in vivo, claim 26 and claims 27-34, which are dependent upon claim 26 or related to it, fulfil the criteria according to PCT Article 33(2) and (3).
3. Since in the present case it is apparently not possible to define the technical features of a compound by **intended use**, but only **by its structure** and since in addition claim 19 contains no data with respect to measuring or relaxation time, the compounds claimed in the latter are not distinguished from the coated ferromagnetic chrome dioxide particles known from

D2 = US-4 661 408

which also bind to antibodies during immunoassay.

Claim 19 therefore fails to fulfil the requirements of PCT Article 33(2).

- 3.1 On similar grounds the subject of claim 35 does not involve an inventive step (PCT 33(3)).
- 3.2 Since claims 20-24 and 36-38 detail technical properties of suitable compounds or agents which contrast with the "low coercivity" and "low remanent magnetism" required of the markers disclosed in D1, these claims fulfil the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51155AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 96/00823	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/02/96	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/03/95
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitslichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____	<input type="checkbox"/> wie vom Anmelder vorgeschlagen	<input checked="" type="checkbox"/> keine der Abb.
	<input type="checkbox"/> weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.	
	<input type="checkbox"/> weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 G01N33/58 G01N33/543 C12Q1/00 C12Q1/68 A61K49/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 G01N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9145 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 91-329371 [45] XP002008119 & JP,A,03 220 442 (TDK CORP.) , 27.September 1991 siehe Zusammenfassung ---	1-5,19, 22,25
A	EP,A,0 180 384 (TECHNICON INSTRUMENTS CORPORATION) 7.Mai 1986 ---	
A	US,A,4 661 408 (H.-P. P. LAU ET AL.) 28.April 1987 ---	
A	WO,A,91 15243 (NYCOMED AS.) 17.Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt --- -/--	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11.Juli 1996		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 22.07.96
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Griffith, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE,A,30 27 012 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR).) 5.Februar 1981 in der Anmeldung erwähnt -----	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-180384	07-05-86	AU-B- 595165	29-03-90
		AU-B- 4902985	08-05-86
		CA-A- 1314769	23-03-93
		JP-A- 61181967	14-08-86
		US-A- 5206159	27-04-93

US-A-4661408	28-04-87	CA-A- 1289873	01-10-91
		DE-A- 3776180	05-03-92
		EP-A- 0240770	14-10-87
		IE-B- 60178	15-06-94
		JP-C- 1773233	14-07-93
		JP-B- 4063813	13-10-92
		JP-A- 62226817	05-10-87

WO-A-9115243	17-10-91	AU-B- 655175	08-12-94
		AU-B- 7565591	30-10-91
		CA-A- 2079688	03-10-91
		EP-A- 0523116	20-01-93
		JP-T- 6507371	25-08-94
		US-A- 5384109	24-01-95

DE-A-3027012	05-02-81	FR-A- 2461521	06-02-81
		JP-C- 1669794	12-06-92
		JP-B- 3035973	30-05-91
		JP-A- 56095331	01-08-81
		US-A- 4329241	11-05-82

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

15 APR 1997

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51155AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 96/ 00823	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/02/1996	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/03/1995
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/58		
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.


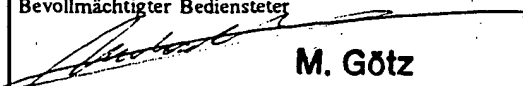
2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt **6** Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 16/08/1996	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.04.97
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  M. Götz Tel. (+49-89) 2399-8687

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☐ der Beschreibung, Seite/n _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

☐ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.
Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

☐ der Zeichnungen, Blatt/Abb. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____
☐ Ansprüche: Nr. _____
☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

5. Die Anwendung der Messung der magnetischen Remanenz von ferri- oder ferromagnetischen Substanzen auf den menschlichen Körper wird vom vorhandenen Stand der Technik nicht nahegelegt. Weder D1 noch D2 geben einen Hinweis darauf, daß die geschilderten *in vitro* Verfahren zu *in vivo* Messungen herangezogen werden können.

Angesichts der auf Seite 10/Zeilen 17 - 28 der Beschreibung genannten Vorteile beruht der Gegenstand der Verfahrensansprüche 26 - 32 sowie der Verwendungen gemäß Ansprüchen 33 und 34 auf erfinderischer Tätigkeit gemäß Art. 33(3) PCT.

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

Gemäß Regel 5.1 (a) (ii) PCT sollten die Dokumente D1 und D2 in der Beschreibung gewürdigt und der darin enthaltene Stand der Technik kurz umrissen werden.



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/58, 33/543, C12Q 1/00, 1/68, A61K 49/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27133 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. September 1996 (06.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00823 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Februar 1996 (29.02.96) (30) Prioritätsdaten: 195 08 772.0 1. März 1995 (01.03.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneisenaustrasse 65, D-10961 Berlin (DE). KÖTTITZ, Roman [DE/DE]; Arnold-Zweig-Strasse 12, D-13189 Berlin (DE). TRAHMS, Lutz [DE/DE]; Reinhardtstrasse 5, D-12103 Berlin (DE). BUNTE, Thomas [DE/DE]; Hilbertstrasse 4, D-12307 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BY, CA, CN, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: PROCESS AND COMPOUNDS FOR USE IN DETECTING ANALYTES BY MEASUREMENT OF RESIDUAL MAGNETISM, AND THE USE OF THE SAID COMPOUNDS (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VERBINDUNGEN ZUR DETEKTION VON ANALYTEN MITTELS REMANENZMESSUNG UND DEREN VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns: a process for the quantitative detection of analytes in fluid and solid phases by measurement of residual magnetism; compounds suitable for that purpose; and the use of said compounds in analysis.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels Bindungsremanenzmessung, dafür geeignete Verbindungen und deren Verwendung in der Analytik.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Verfahren und Verbindungen zur Detektion von Analyten mittels Remanenzmessung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand,
5 daß heißt Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten
in Flüssig- und Festphasen mittels Remanenzmessung, dafür geeignete
Verbindungen und deren Verwendung in der Analytik.

Es ist bekannt, daß quantitative Immunoassays sowie andere Bindungsassays (z.B.
10 Rezeptorbindungsassays) es ermöglichen, eine sehr große Anzahl von Substanzen,
die auch von biologischer Relevanz sein können, in Proben unterschiedlicher
Zusammensetzung zu bestimmen. In der Regel wird hierbei jedoch nur ein
Parameter pro Probe in einem Assay bestimmt. Eine aktuelle Übersicht der
verschiedenen Verfahren gibt T. Chard [An Introduction to Radioimmunoassay and
15 Related Techniques : Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular
Biology, 4. ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990)]. Grundlage aller
Bindungsassays ist die hohe Nachweisempfindlichkeit isotonen- oder anders
markierter Verbindungen in Kombination mit der großen Spezifität von Ligand-
Rezeptorreaktionen.

20

Die bekannten Assayverfahren haben jedoch folgende Nachteile:

- Die Verfahren für die simultane Bestimmung verschiedener Analyten
innerhalb derselben Probe basieren auf der Bindung unterschiedlich radio-,
25 fluoreszenz- oder enzymologisch markierter Sonden an die Analyten. Dabei
wird in der Regel nach anschließender Separation und Wäsche die
nichtgebundene bzw. gebundene Aktivität der Sonde für die quantitative
Bestimmung des Analyten gemessen. Die Menge der einsetzbaren
unterschiedlichen Sondenlabel ist dabei stark begrenzt. So treten zum
30 Beispiel im Falle von unterschiedlichen Radioisotopen als Sondenmarkierung
sogenannte Überlappungsphänomene auf, die zu einem rapiden Verlust der
quantitativen Genauigkeit der individuellen Signale führen. Die Kombination
verschiedener Enzyme als Sondenlabel verursacht vergleichbare Probleme,
wobei die Durchführbarkeit hier zusätzlich durch die erforderliche Suche
35 nach Reaktionsbedingungen, die die simultane Bestimmung der
Enzymreaktionen in einem System erlauben, erschwert wird.

- Die Sensitivität der Verfahren ist begrenzt zum Beispiel durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Matrix und Sonde, oder aber durch limitierte Markierungsmöglichkeit der Sonde (geringe spezifische Aktivität).
- 5 • Die erfolgreiche Durchführung der Verfahren setzt häufig eine Aufarbeitung des gewonnenen Probenmaterials (z. B. Herstellung von Serum bzw. Plasma aus Vollblut, Extraktion von Proben mit organischen Lösungsmitteln, Anreicherung des Analyten mittels chromatographischer Verfahren u.s.w.) voraus.
- 10 • Für die erfolgreiche Durchführung der Verfahren sind Separations- und Waschschrte, die der Trennung von gebundenen und ungebundenen Rezeptoren bzw. Liganden dienen, unerlässlich.
- 15 • Für die Durchführung von Radioimmunoassays ist der Einsatz teurer und in der Handhabung aufwendiger strahlender Nuklide erforderlich.
- Die Lagerung der bisher verwendeten Marker bereitet in der Praxis oft Probleme, da sie entweder nicht stabil sind (Radioimmunoassays) und
20 deshalb stets frisch erzeugt werden müssen oder aber empfindlich auf Umgebungseinflüsse reagieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein neuartiges Verfahren und Substanzen zu finden, die dem oben genannten Stand der Technik überlegen sind.

25

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß die qualitative und/oder quantitative Detektion von Analyten in Flüssig- und/oder Festphasen gelingt, wenn stabile oder quasistabile ferro- oder
30 ferrimagnetische Substanzen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays oder Bindungsassays eingesetzt werden und die remanente Magnetisierung der Probe als Meßgröße bestimmt wird.

Nachfolgend werden zunächst Verfahren beschrieben, die die Nachteile der
35 bekannten Verfahren überwinden.

Die erfindungsgemäßen Verfahren beruhen auf der Verwendung kolloidaler ferromagnetischer oder ferrimagnetischer Substanzen, im folgenden auch als

magnetische Markierung bezeichnet, die mit nachzuweisenden Substanzen - im folgenden auch als Analyte bezeichnet - oder strukturspezifischen Substanzen kombiniert werden. Derartige Kombinationen aus magnetischen Markierungen mit Analyten oder strukturspezifischen Substanzen, werden im folgenden auch als magnetische Marker bezeichnet. Durch die Verwendung des Begriffes kolloidale Substanzen wird sowohl der Größenbereich der Teilchen oder Substanzen auf den Größenbereich von Kolloiden, d.h. den Bereich von 1 nm bis ca. 1000 nm, als auch deren Verwendung als dispergierte Phase in einem geeigneten Dispersionsmedium, das zumeist wäbrig ist, beschrieben. Kolloidale Substanzen, die im folgenden auch als Teilchen bezeichnet werden, können zum Zweck der verbesserten Lager- und Transportfähigkeit auch in getrockneter Form oder eingefroren vorliegen, während der Durchführung von Messungen liegen sie jedoch im allgemeinen in flüssiger Phase dispergiertem Zustand vor.

Eine wesentliche Grundlage der Erfindung ist, daß die Zeitabhängigkeit der Magnetisierung ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Substanzen nach Abschalten eines äußeren magnetisierenden Feldes sehr empfindlich von Material und Form (Anisotropiekonstante des verwendeten Teilchenmaterials), Volumen und der Temperatur der verwendeten Teilchen abhängt. Das ist verursacht durch eine Drehung des internen Magnetisierungsvektors innerhalb der Teilchen. Man bezeichnet diesen Mechanismus als Néelsche Relaxation. Relaxiert die Magnetisierung der Teilchen innerhalb der Meßzeit, so wird das als intrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet. Teilchen, deren Néel-Relaxationszeiten wesentlich länger als der Beobachtungszeitraum sind, werden als remanente Teilchen oder auch als stabile Teilchen bezeichnet. Teilchen, deren Néel-Relaxationszeiten in der Größenordnung des Beobachtungszeitraumes sind, werden als quasistabile Teilchen bezeichnet.

Eine weitere wesentliche Grundlage der Erfindung ist es, daß die Magnetisierung einer Gesamtheit frei beweglicher stabiler oder quasistabiler ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen nach Abschalten eines äußeren magnetisierenden Feldes innerhalb der Meßzeit durch einen zweiten Mechanismen relaxiert. Dabei kommt es zu einer Drehung des gesamten kolloidalen Teilchens innerhalb der umgebenden Flüssigkeit, wobei die Zeitkonstante vom hydrodynamischen Durchmesser der Teilchen einschließlich der Hülle, der Viskosität der Trägerflüssigkeit und der Temperatur abhängt. Diese Parameter werden hauptsächlich durch die Umgebung der Teilchen bestimmt. Der

Mechanismus wird als Brownsche Relaxation oder extrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet.

- Das erfindungsgemäße Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen wird durchgeführt, indem
- (i) zunächst strukturspezifische Substanzen mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend
 - (ii) diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen zu der zu vermessenden Probe gegeben werden,
 - (iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und
 - (iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen (magnetischen Markierung) mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird,
- wobei die durch spezifische Bindung auftretende Remanenz und deren Ausmaß zur Analyse herangezogen wird.

Die bei den Verfahren des Standes der Technik nur in Ausnahmefällen mögliche Diskriminierung zwischen gebundenen und ungebundenen Markern wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren durch die Ausnutzung der verschwindenden Remanenz (d.h. des extrinsischen Superparamagnetismus) der ungebundenen magnetischen Marker in der flüssigen Phase ermöglicht. Die Gesamtheit der gebundenen magnetischen Marker hingegen zeigt eine - vom Teilchenmaterial abhängige - meßbare Remanenz. Bei der Messung der Remanenz der zu bestimmenden Probe wird also nur der Anteil der gebundenen magnetischen Marker erfaßt. Das Verfahren wird daher nachfolgend auch als Messung der Bindungsremanenz oder Bindungsremanenzmessung bezeichnet und basiert auf der quantitativen Detektion gebundener strukturspezifischer Marker.

- Mit anderen Worten, die Bestimmung des Analyten kann auch ohne aufwendige Separations- und Waschschrift erfolgen, da nur die an den Analyten spezifisch gebundenen stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen (die zum Zwecke der Verleihung einer Spezifität mit strukturspezifischen Substanzen kombiniert sind) Remanenz verursachen, wohingegen die Magnetisierung von gleichzeitig in der Probe vorhandenen überschüssigen, ungebundenen stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen (die ebenfalls mit strukturspezifischen Substanzen kombiniert sind) schon

vor Beginn der Messung durch extrinsischen Superparamagnetismus abgeklungen ist.

5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Verfahren in der Weise modifiziert, daß anstelle der strukturspezifischen Substanzen die Analyte selbst mit den stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen kombiniert werden, wie dies analog z.B. bei der Durchführung von kompetitiven Radioimmunoassays häufig angewendet wird. Den Proben muß dann noch zusätzlich die strukturspezifische Substanz zugefügt werden.

10

Das Verfahren kann aber auch als Multianalytassay, das eine direkte simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Analyten in Flüssigkeiten oder Festsubstanzen ermöglicht, durchgeführt werden. Dazu ist es erforderlich, die Analyten zunächst mit unterschiedlichen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Substanzen mit ausreichend diskreten Koerzitivfeldstärken zu markieren. 15 Während der Bindung der magnetischen Marker wird ein magnetisierendes Feld (primäres Magnetisierungsfeld) angelegt, welches zu einer Ausrichtung aller in der Probe enthaltenen magnetischen Marker entlang ihrer leichten Achse führt. Anschließend wird die Remanenz der Probe bestimmt. In weiteren Schritten wird die Probe mit externen Gegenfeldern (entgegengesetzt zum primären 20 Magnetisierungsfeld), die in ihrer Stärke mit den Koerzitivfeldstärken der magnetischen Markierungen abgestimmt sind, ummagnetisiert. Dadurch wird es möglich, gezielt immer nur diejenigen Markierungen umzuorientieren, deren Koerzitivfeldstärken geringer als das angelegte magnetisierende Feld sind. Zwischen 25 den einzelnen Schritten der Ummagnetisierung wird die Remanenz der Probe jeweils erneut bestimmt.

Aus den gemessenen Remanenzen der Probe bei jedem einzelnen Ummagnetisierungsschritt kann somit der Anteil der verschiedenen gebundenen magnetischen Marker quantifiziert werden.

30 Durch dieses Verfahren ist es möglich, simultan mehrere Analyten pro Probe zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren, sowie Varianten des Verfahrens können in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, 35 Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik und medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommen.

Der Nachweis der Bindungsremanenz erfolgt mit bekannten, hierfür geeigneten Meßanordnungen, wie zum Beispiel Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDs), wobei zunächst eine Aufmagnetisierung mittels eines geeigneten Magnetfeldes vorgenommen wird und anschließend, nach Abschalten des Feldes, die
5 Messung der Remanenz der magnetisierten strukturspezifischen Substanz oder davon abhängiger Signale durch empfindliche Magnetfeldsensoren, durchgeführt wird.

Während der Messung kann die Probe vorteilhafterweise bewegt werden. Insbesondere vorteilhaft ist eine Modulation des Signals durch Vibration oder
10 Rotation der Probe. Damit wird eine Transformation des dc-Meßsignals in einen höheren Frequenzbereich realisiert.

Zur Messung können - neben den genannten SQUIDs - auch als Gradiometer verschaltete Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-
15 Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.

Bei Verwendung von Sensoren, die dc-Felder messen können (z.B. SQUIDs, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler) ist eine Messung der Remanenz nach vorheriger Aufmagnetisierung der
20 Probe auch möglich, ohne daß diese bewegt wird.

Eine geeignete Meßanordnung ist beispielhaft in Figur 1 abgebildet. Eine derartige Anordnung wurde auch in den nachfolgenden Beispielen verwendet.

25 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verbindungen zur Messung der Bindungsremanenz. Geeignete Verbindungen bestehen aus kolloidalen Suspensionen ferrimagnetischer oder ferromagnetischer Substanzen und strukturspezifischen Substanzen oder Analyten.

30 Unter strukturspezifischen Substanzen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Substanzen zu verstehen, die spezifisch an die gewünschte Struktur binden, wie z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten wie Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten,
35 spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipoproteine u.s.w..

Darunter sind Substanzen bevorzugt, deren Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt, insbesondere Substanzen deren Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt.

- 5 Als ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Substanzen können alle ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen verwendet werden, deren intrinsische Néel-Relaxationszeit größer oder gleich der Meßzeit ist und die somit stabil bzw. quasistabil sind.
- 10 Besonders geeignet sind alle ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen, deren Relaxationszeit bei 20°C länger als 10^{-4} Sekunden ist. Insbesondere geeignet sind alle ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen, deren Relaxationszeit länger als 1 Sekunde ist.
- 15 Die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen können vorteilhafterweise mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, synthetischen Polymeren und/oder Lipiden stabilisiert sein.
- 20 Die Partikelgrößen der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen liegen vorteilhafterweise zwischen 1 nm und 1000 nm. Insbesondere bevorzugt sind Partikelgrößen zwischen 2 nm und 500 nm. (Die Angaben hinsichtlich der Partikelgröße beziehen sich auf den hydrodynamischen Durchmesser.)
- 25 Als ferro- oder ferrimagnetische Substanzen sind insbesondere stabile oder quasistabile kolloidale Teilchen aus Eisenoxiden (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Bariumferrit, Strontiumferrit, Reineisen, Chromdioxid, Nickel, Kobalt sowie Eisenoxiden mit Mangan-, Kupfer-, Nickel- oder Kobaltzusätzen (wie z.B. in DE 30 27 012 und DE 41 16 093 beschrieben) geeignet.
- 30 Die Herstellung der erfindungsgemäß einsetzbaren Verbindungen, bestehend aus stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen, die mit strukturspezifischen Substanzen oder Analyten verbunden sind, erfolgt mit Hilfe der im Bereich der Immuno-, Peptid- und Proteinchemie geläufigen Verfahren.
- 35 Dabei wird die strukturspezifische Substanz oder der Analyt über kovalente Bindungen mit den die stabilisierende Hülle der ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen bildenden Substanzen verknüpft. Als stabilisierende Hülle kommen z.B. Kohlenhydrate, Peptide, Nukleotide, Proteine, Lipide, Tenside

oder Polymere infrage. Besonders geeignete Verknüpfungsmethoden sind z.B. die Aktivierung und Kopplung mittels Carbodiimiden [Jakoby and Wilchek, eds., (1974) Methods Enzymol 34], die Bildung von Schiff'schen Basen nach Einwirkung von Periodaten auf Kohlenhydrate enthaltende Verbindungen (Wichek and Bayer, eds., 5 Methods Enzym 184:177), die gegebenenfalls zur weiteren Stabilisierung anschließend noch reduziert werden, die Kopplung mittels Glutardialdehyd [Heitzmann and Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 (1974) 3537], die Quervernetzung bromoacetylierter Teilchen mit thiolyltierten Substanzen [Angerer et al., Cell 9 (1976) 81], sowie die reduktive Alkylierung [Bayer et al., J. Histochem. 10 Cytochem. 24 (1976) 933].

Es können auch ferromagnetische oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen, mit einer stabilisierenden Hülle aus der strukturspezifischen Substanz oder dem Analyten selbst hergestellt werden, indem die Teilchen nach Herstellung entweder direkt in 15 eine Lösung der strukturspezifischen Substanz oder des Analyten, gegebenenfalls in Gegenwart weiterer Hilfsstoffe wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate sowie natürliche, synthetische oder partialsynthetische oberflächenaktive Substanzen usw. gebracht werden, bzw. direkt in Gegenwart der strukturspezifischen Substanzen oder Analyten hergestellt werden.

20

Zum Zweck der Durchführung von Multianalytassays können auch Mischungen von Verbindungen, die aus mehreren unterschiedlichen magnetischen Markern bestehen, wobei die unterschiedlichen magnetischen Marker aus Kombinationen unterschiedlicher strukturspezifischer Substanzen oder nachzuweisender Analyte mit 25 unterschiedlichen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen bestehen, zur Anwendung kommen. Grundlage dieser erfindungsgemäßen Verwendung von Kombinationen unterschiedlicher magnetischer Marker ist es, daß als magnetische Markierung für die jeweiligen strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Analyte ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit 30 unterscheidbaren Koerzitivfeldstärken (H_c) verwendet werden, wobei die Parameter Koerzitivfeldstärke (H_c) und remanente Magnetisierung (M_R) für die unterschiedlichen magnetischen Markierungen in bekannter Weise vorab separat bestimmbar und somit bekannt sind.

35

Die mit den ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Substanzen markierten strukturspezifischen Substanzen können auch in getrockneter Form (z.B. als Lyophilisate), gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Hilfsstoffen, die die Trocknung erleichtern oder die Stabilität des getrockneten Produkts erhöhen,

vorliegen. Die Herstellung der gebrauchsfertigen Mittel aus derartigen Lyophilisaten erfolgt dann durch Resuspendieren in einem geeigneten Suspensionsmedium unmittelbar vor der Anwendung.

- 5 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft somit Mittel zur Bindungsremanenzmessung enthaltend ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Substanzen in einem geeigneten Suspensionsmedium.

10 Als Suspensionsmedien kommen alle Flüssigkeiten in Betracht in denen die kolloidalen Teilchen frei beweglich sind. Soll die Messungen ohne Separations- oder Waschschriffe durchgeführt werden, muß die Viskosität des verwendeten Suspensionsmediums mit der Néel-Relaxationszeit der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen und der Meßzeit abgestimmt werden, da das
15 Suspensionsmedium wesentlich die Zeitkonstante der Brownschen Relaxation bestimmt. Andernfalls kann z.B. bei Verwendung von Teilchen mit kurzer Relaxationszeit (z.B. 0,01 Sekunden) in hochviskosen Suspensionsmedien (z.B. 80 % Glycerol) und kurzer Meßzeit (z.B. 0,0001 Sekunden nach Abschalten des äußeren Feldes) die Brownsche Relaxation (extrinsischer Superparamagnetismus) derart verlangsamt sein, daß nicht mehr zwischen gebundenen und ungebundenen
20 strukturspezifischen Markern unterschieden werden kann. Es ist im allgemeinen vorteilhaft, Suspensionsmedien einer Viskosität, die kleiner als 100 mPas ist, zu verwenden.

Als Suspensionsmedium geeignet sind Wasser, wäßrige Lösungen oberflächenaktiver
25 Hilfsstoffe, wie z.B. Tenside oder oligomere oder polymere Kohlenhydrate und Proteine, sowie Mischungen aus Wasser mit Alkoholen wie z.B. Glycerol und Polyethylenglykol, wobei für Injektionszwecke geeignetes Wasser bevorzugt ist. Die Suspensionsmedien können zusätzlich den osmotischen Druck verändernde Hilfsstoffe, wie z.B. Kochsalz, enthalten. Des weiteren können den pH-Wert
30 bestimmende Puffersubstanzen, wie z.B. Phosphate, enthalten sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Verbindungen in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Messung der Bindungsremanenz.

35 Aufgrund des auf physikalischen Mechanismen beruhenden Bindungsnachweises können unspezifische Meßsignale (Matrixphänomene) weitgehend ausgeschlossen werden. Die Spezifität des Verfahrens hängt somit nur noch von der "wahren"

Spezifität der strukturspezifischen Substanz (Kreuzreaktivität von Antikörpern, unspezifische Bindung von Liganden) ab.

5 Aufgrund der hohen Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die sonst üblichen Detektionsgrenzen von Bindungsassays mühelos unterschritten.

10 Im Gegensatz zu bekannten Methoden (JP-235774 und WO 91/15243) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht die statische Magnetisierung in Anwesenheit eines äußeren magnetisierenden Feldes, sondern in Abwesenheit eines Magnetfeldes die Bindungsremanenz oder davon abhängige Signale gemessen. Erst dadurch werden Informationen über den Bindungszustand der Marker zugänglich.

15 Desweiteren wird dadurch auch eine Beeinflussung des Meßsignals durch dia- oder paramagnetische Komponenten beziehungsweise Verunreinigungen vermieden, was zu einer weiteren Steigerung der Meßempfindlichkeit beiträgt.

20 Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Bindungsremanenzmessung können des weiteren auch dazu verwendet werden, den Aufenthaltsort ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen *in vivo* nachzuweisen. Hierbei ist von besonderem Vorteil, daß zur Bestimmung der Bindungsremanenz ferro- oder ferrimagnetische Substanzen verwendet werden können und damit die am Menschen besonders kritische Anwendung radioaktiver Isotope vermieden wird, wobei die Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens die von gebräuchlichen nuklearmedizinischen Verfahren der Gammazintigraphie oder Positronen-
25 Emissions-Tomographie erreicht. Darüber hinaus ist eine vorherige Abtrennung von im Blut zirkulierenden ungebundenen Marker überflüssig, da dieser (im Gegensatz zu radiodiagnostischen Methoden) kein "Störsignal" verursacht und somit die Detektion des spezifisch gebundenen Markers nicht beeinflusst.

30 Erfindungsgemäß wird hierfür dem Patienten eine Suspension stabiler oder quasistabiler ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen verabreicht. Als Applikationswege sind die lokale Auftragung, die perorale Applikation und alle Formen der parenteralen Applikation geeignet. Besonders geeignet sind intravasale Applikationsformen.

35 Kolloidale Substanzen werden im Organismus verteilt, wobei das Verteilungsmuster im Körper vom Applikationsweg sowie von verschiedenen anderen pharmakokinetischen Parametern beeinflusst wird. Die orts aufgelöste Bestimmung

der Bindungsremanenz zu unterschiedlichen Zeiten nach Applikation stabiler oder quasistabiler ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen kann dazu dienen, pathologische Zustände im Körper, die sowohl durch ungewöhnliche Anreicherungen oder fehlendes Auftreten von Anreicherungen gekennzeichnet sind, festzustellen.

Besonders vorteilhaft kann zur Darstellung pathologischer Strukturen im menschlichen Körper die erfindungsgemäße Verwendung von mit strukturspezifischen Substanzen kombinierten stabilen oder quasistabilen ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen (magnetische Marker) sein. Hier führt die spezifische Bindung der magnetischen Marker an die pathologische Struktur zu einem spezifischen Signal, das erfindungsgemäß mit den für die Durchführung von Bindungsassays beschriebenen Verfahren der Bindungsremanenz *in vivo* bestimmt werden kann.

Als Beispiel für eine erfindungsgemäße Anwendung von stabilen oder quasistabilen ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen in Kombination mit den Verfahren der Bindungsremanenzmessung, sei die Detektion von Tumoren im Körper durch Verwendung von tumorspezifischen magnetischen Markern genannt.

Tumorspezifische Marker können z.B. Kombinationen von stabilen oder quasistabilen ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit tumorspezifischen Substanzen, wie z.B. Antikörpern, Antikörperfragmenten, Peptiden, Rezeptoren, Proteinen, Nukleinsäuren, Oligonukleotiden, monomeren, oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, sein.

Weitere Beispiele für mögliche Anwendungen sind die Darstellung von Thromben, atherosklerotischen Plaques, entzündlichen Reaktionen, rheumatischen oder rheumatoiden Veränderungen, wobei jeweils vorteilhafterweise erfindungsgemäße Kombinationen aus stabilen oder quasistabilen ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen mit für die jeweilige pathologische Struktur spezifischen Substanzen als magnetische Marker eingesetzt werden.

Die *In vivo*-Messung der räumlichen Verteilung einem Menschen applizierter stabiler oder quasistabiler magnetischer Marker, erfolgt erfindungsgemäß nach zwei Varianten:

1. Erzeugung eines möglichst homogen Magnetfeldes in der interessierenden Körperregion, Abschalten des Feldes und Messung der räumlichen

Verteilung der Bindungsremanenz mittels eines SQUID-Multikanalsensors, wie er z.B. für biomagnetische Untersuchungen eingesetzt wird [vgl. D. Drung, IEEE Trans. Appl. Supercond., 5 (1995) 2112-2117]. Dieser sollte das Meßobjekt möglichst vollständig umschließen. Zur Erzeugung
5 ausreichender Meßinformation ist eine mehrfache Meßdurchführung unter sequentieller Abrasterung des Meßobjektes vorteilhaft.

2. Sequentielle Erzeugung eines räumlich begrenzten lokalen Feldes, Abschalten des Feldes und Messung der räumlichen der Bindungsremanenz mittels eines
10 Einkanalsensors. Die Verwendung eines Multikanalsensors ist ebenfalls möglich.

Bei beiden Methoden ist zur Gewinnung maximaler Information sowohl die Magnetisierung des Meßobjektes als auch die Messung des resultierenden
15 Magnetfeldes in allen drei Raumrichtungen zu bevorzugen.

Die Auswertung der Messdaten kann durch ein geeignetes Approximationsverfahren erfolgen. So kann man z.B. das Modell des magnetischen Dipols, Multipols oder Multi-Dipols zugrunde legen. Die speziellen Parameter des Modells, insbesondere
20 die Orte der Dipole oder Multipole, werden dann mittels des Approximationsverfahren gefunden, das die Abweichungen zwischen Meßdaten und Modellparametern minimiert. Aus diesen Parametern läßt sich die räumliche Verteilung der magnetisierten Teilchen in an sich bekannter Weise ermitteln.

25 Eine analoge Vorgehensweise ist bekannt und bewährt bei der Analyse der Magnetfelder von bioelektrischen Strömen.

Für die Messung der Bindungsremanenz *in vivo* eignen sich grundsätzlich dieselben Substanzen - bzw. daraus bereitete Mittel - wie sie auch bei *In vitro*-Untersuchungen
30 zum Einsatz kommen.

Besonders geeignet für eine *In vivo*-Anwendung sind magnetische Markierungen, die biologisch abbaubar und verträglich sind. Dies trifft insbesondere für magnetische Markierungen zu, die aus Eisenoxiden oder aus Kombinationen von Eisenoxiden mit
35 Mangan oder Kobalt bestehen. Magnetische Partikel, an die nach den genannten Verfahren strukturspezifische Substanzen geknüpft werden können, finden z.B. in der Kernspintomographie Anwendung und werden u.a. in der WO 92/12735 der WO 92/22586 sowie der EP 0 186 616 beschrieben. Ein weitere Aspekt der

Erfindung betrifft somit die Verwendung von magnetischen Markierungen in einem *In vivo*-Verfahren zur Bindungsremanenzmessung.

5 Unter strukturspezifischen Substanzen sind im Zusammenhang mit der *In vivo*-Anwendung der Bindungsremanenzmessung insbesondere alle Substanzen zu verstehen, die spezifisch an nachzuweisende Strukturen des menschlichen Körpers binden. Besonders geeignet sind Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren,
10 Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine. Von den an Rezeptoren bindenden Agonisten sind insbesondere Zytokine, Lymphokine oder Endotheline geeignet.

15 Gut geeignet sind alle strukturspezifischen Substanzen, die eine Bindungskonstante im Bereich von $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ aufweisen. Insbesondere geeignet sind alle strukturspezifischen Substanzen, die eine Bindungskonstante im Bereich von $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ aufweisen.

20 Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

Beispiel 1

100 μg eines monoklonalen Antikörpers gegen Collagen III, im folgenden Anti-Collagen III genannt, werden in 500 μl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. 1 ml dextrans-coatete Magnetitsuspension (Meito Sangyo) mit 1 Mol Fe/l und einer Teilchengröße von ca. 40 nm (hydrodynamischer Durchmesser) wird über eine Sephadex Säule (Pharmacia PD 10) mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat umgepuffert. Zu der Suspension werden 0,5 ml 10 mmol Natriumperiodat-Lösung gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Anschließend wird über eine PD 10 mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung eluiert. Zu der Suspension wird die Anti-Collagen III-Lösung gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden 5 mg NaBH_4 als Festsubstanz zugegeben und kurz geschwenkt. Die Mischung wird 8 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden die magnetitmarkierten Anti-Collagen III (im folgenden Mag-Anti-Collagen III genannt) über eine PD 10 Säule mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) eluiert.

Eine Lösung von 5 μg Collagen III in 200 μl Puffer [phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)] wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. (Das Probengefäß dient dabei als feste Phase, an der ein Teil des Collagens fixiert wird.) Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit phosphatgepufferte Kochsalzlösung, enthaltend 0,1 % Tween® 20 (nachfolgend als PBST bezeichnet), gespült, um nicht fixiertes Collagen auszuwaschen. In das Probengefäß werden dann 5 μl Mag-Anti-Collagen III gelöst in 200 μl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 2 mT 4 cm unterhalb des Squid-Detektors magnetisiert (siehe Figur 1). Nach Abschalten des Magnetfeldes wird die Probe vermessen. Dazu wird die Probe während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Aus der Differenz der - nach Abschalten des Magnetfeldes - ermittelten magnetischen Flußdichten vor und nach Entfernung der Probe aus dem Messfeld ergibt sich die Remanenz. Im Falle des vorliegenden Beispiels konnte eine Remanenz festgestellt werden.

Beispiel 2

Eine Lösung von 5 μg Collagen V in 200 μl PBS Puffer pH 7,4 wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase
5 verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit PBST Waschpuffer pH 7,4 gespült. Zu der Probe werden 5 μl Mag-Anti-Collagen III, hergestellt nach Beispiel 1, in 200 μl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 2 mT 4 cm unterhalb des SQUID-Detektors magnetisiert (siehe
10 Figur 1). Nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes wird die Probe vermessen. Dazu wird die Probe während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Bei der Collagen V enthaltenden Probe ist keine Remanenz feststellbar.

15 Beispiel 3

Aus 10 ml einer 1,9 mg/ml Collagen III-Lösung in PBS (pH 7,4) werden jeweils 5 ml der folgenden Verdünnungen hergestellt:

20 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml

Von jeder Verdünnung werden jeweils 1 ml in jeweils ein Polystyrolröhrchen (Fassungsvolumen 2,5 ml) pipettiert. Die drei Probenröhrchen werden 1 Stunde bei 37°C inhiert. Danach wird der Inhalt der Röhrchen verworfen. Die Röhrchen
25 werden 3mal mit je 1 ml PBST gewaschen.

In jedes Röhrchen werden 1 ml einer 1 : 100-Verdünnung des Magnetit markierten Antikörpers, hergestellt gemäß Beispiel 1, gegeben. Die Röhrchen werden 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach werden die Proben mit der in Figur 1 skizzierten Meßanordnung magnetisiert (2 mT) und nach Abschalten des
30 magnetisierenden Feldes werden die Proben vermessen. Dazu werden die Proben während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Die Auswertung der gemessenen Signale ist ein Maß für die Bindungsremanenz und ergibt den in Figur 2 wiedergegebenen Zusammenhang.

Patentansprüche

1. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und/oder Festphasen, dadurch gekennzeichnet, daß stabile oder
5 quasistabile ferro- oder ferrimagnetische Substanzen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden und die remanente Magnetisierung der Probe als Meßgröße bestimmt wird.
- 10 2. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays, dadurch gekennzeichnet, daß gebundene magnetische Marker zum Zeitpunkt der Messung in ihrer Gesamtheit eine remanente Magnetisierung der Probe bewirken, während die
15 Magnetisierung ebenfalls in der Probe vorhandener ungebundener magnetischer Marker zum Zeitpunkt der Messung in ihrer Gesamtheit durch extrinsischen Superparamagnetismus abgeklungen ist.
3. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, dadurch gekennzeichnet, daß
20 (i) zunächst strukturspezifische Substanzen mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend
(ii) diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen zu der zu vermessenden Probe gegeben werden,
(iii) die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten
25 Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und
(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei die durch spezifische Bindung auftretende Remanenz und deren
Ausmaß zur Analyse herangezogen wird.
- 30 4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 dadurch gekennzeichnet, daß anstelle der strukturspezifischen Substanzen nachzuweisende Analyte mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und den zu vermessenden Proben die strukturspezifischen Substanzen zugesetzt
35 werden.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen, Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
5
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l)⁻¹ haben.
10
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l)⁻¹ haben.
15
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe während der Messung bewegt und damit das Probensignal moduliert wird.
20
9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren als Gradiometer geschaltete Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
25
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren SQUIDs eingesetzt werden.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch stufenweise Magnetisierung der zu vermessenden Probe eine simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Analyten in Flüssigkeiten oder Festsubstanzen durchgeführt wird.
30
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß für eine simultane quantitative Bestimmung von Analyten unterschiedliche ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit diskreten Koerzitivfeldstärken verwendet werden.
35

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die intrinsische Néel-Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen größer als die Messzeit ist.
- 5 14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Néelsche Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen bei 20°C länger als 10^{-4} Sekunden ist.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Néelsche Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen bei 20°C länger als 1 Sekunde ist.
- 15 16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 1 bis 1000 nm aufweisen.
- 20 17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 2 bis 500 nm aufweisen.
- 25 18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, synthetischen Polymeren und/ oder Lipiden stabilisiert sind.
- 30 19. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen von stabilen oder quasistabilen ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen bestehen.
- 35 20. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die länger als 10^{-4} Sekunden ist.

21. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen und ferromagnetischen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die längerer als 1 Sekunde ist.
- 5 22. Verbindungen gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten, Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten, sonstige spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
- 10 23. Verbindungen zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 1 - 18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen stabile oder quasistabile kolloidale Teilchen aus Eisenoxiden, Bariumferrit, Strontiumferrit, Reineisen, Chromdioxid, Nickel, Kobalt sowie Eisenoxiden mit Mangan-, Kupfer-, Nickel- oder Kobaltzusätzen sind.
- 15 24. Mittel zur Verwendung in Verfahren nach den Ansprüchen 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit unterschiedlichen Koerzitivfeldstärken enthalten.
- 20 25. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 18 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik oder medizinischen Diagnostik.
- 25 26. Verfahren zur Detektion von in den menschlichen Körper eingebrachter oder auf den menschlichen Körper aufgetragener ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Remanenz der Magnetisierung der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen nach Abschalten eines magnetisierenden Feldes bestimmt wird.
- 30 27. Verfahren zur Detektion in den menschlichen Körper eingebrachter oder auf den menschlichen Körper aufgetragenen ferro- oder ferrimagnetischer Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst
- 35 (i) strukturspezifische Substanzen mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen Substanzen markiert werden und anschließend

(ii) diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen in den lebenden Organismus eingebracht oder auf den Organismus aufgetragen werden,

(iii) das interessierende Volumen des Organismus mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und

(iv) nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird.

- 5
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß als
10 strukturspezifische Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine verwendet werden.
- 15
29. Verfahren gemäß den Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die
spezifisch an Rezeptoren bindenden Agonisten oder Antagonisten Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten sind.
- 20
30. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die
strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
- 25
31. Verfahren gemäß den Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die
strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
- 30
32. Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß
als Magnetfeldsensoren Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDs), Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
- 35
33. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 19 bis 23, in
Verfahren gemäß den Ansprüchen 27 bis 32.

34. Verwendung ferri- oder ferromagnetischen Substanzen in Verfahren gemäß Anspruch 26.
- 5 35. Mittel zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 27 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mischung verschiedener ferri- oder ferromagnetischer Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen enthalten.
- 10 36. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 32, dadurch gekennzeichnet, die Néel-Relaxationszeit der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen bei 37°C größer als 10^{-4} Sekunden ist.
- 15 37. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 26 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Néel-Relaxationszeit der ferro- oder ferrimagnetischen Substanzen bei 37°C größer als 1 Sekunde ist.
- 20 38. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 36 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß die ferri- oder ferromagnetischen Substanzen Eisenoxide oder Eisenoxide mit Mangan-, Kupfer-, Nickel- oder Kobaltzusätzen sind.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 September 1996 (18.09.96)	
International application No. PCT/EP96/00823	Applicant's or agent's file reference 51155AWOM1XX
International filing date (day/month/year) 29 February 1996 (29.02.96)	Priority date (day/month/year) 01 March 1995 (01.03.95)
Applicant WEITSCHIES, Werner et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 August 1996 (16.08.96)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Mirjam Van Straten

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Canadian Patent Office
The Commissioner of Patents
50 Victoria Street
Ontario K1A 0C9
CANADA

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

12 November 1997 (12.11.97)

International application No.

PCT/EP96/00823

International filing date (day/month/year)

29 February 1996 (29.02.96)

Applicant

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

K. Andreasson

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

P...ENT COOPERATION .REA1 .

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

12 November 1997 (12.11.97)

International application No.

PCT/EP96/00823

International filing date (day/month/year)

29 February 1996 (29.02.96)

Applicant

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

K. Andreasson

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/58, 33/543, C12Q 1/00, 1/68, A61K 49/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27133 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. September 1996 (06.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00823 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Februar 1996 (29.02.96) (30) Prioritätsdaten: 195 08 772.0 1. März 1995 (01.03.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneisenaustrasse 65, D-10961 Berlin (DE). KÖTTITZ, Roman [DE/DE]; Arnold-Zweig-Strasse 12, D-13189 Berlin (DE). TRAHMS, Lutz [DE/DE]; Reinhardtstrasse 5, D-12103 Berlin (DE). BUNTE, Thomas [DE/DE]; Hilbertstrasse 4, D-12307 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BY, CA, CN, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: <u>PROCESS AND COMPOUNDS FOR USE IN DETECTING ANALYTES BY MEASUREMENT OF RESIDUAL MAGNETISM, AND THE USE OF THE SAID COMPOUNDS</u> (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VERBINDUNGEN ZUR DETEKTION VON ANALYTEN MITTELS REMANENZMESSUNG UND DEREN VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns: a process for the quantitative detection of analytes in fluid and solid phases by measurement of residual magnetism; compounds suitable for that purpose; and the use of said compounds in analysis.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels Bindungsremanenzmessung, dafür geeignete Verbindungen und deren Verwendung in der Analytik.</p>		